UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BEZIEHUNGEN VON FORM UND FLIESSFÄHIGKEIT MENSCHLICHER ERYTHROZYTEN

Gerhard Wiese

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535726_0038

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität
München
Direktor: Prof. Dr. Manfred Kiese

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BEZIEHUNGEN VON FORM UND FLIESSFÄHIGKEIT MENSCHLICHER ERYTHROZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerhard W i e s e
aus Gräfelfing
München 1980

mit Genehmigung der Fakultät Medizin
der Universität München

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. J. Remien
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Kiese
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11. März 1980

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. EINLEITUNG 1

II. MATERIAL UND METHODEN 6

1. Methodik 6

a) Zweck und Prinzip der Messung 6

b) Messkammer 7

c) Filter (Filterproblem) 9

d) Versuchsaufbau 14

e) Vorbereitung des Versuchs 17

f) Versuchsdurchführung 18

g) Filterreinigung 20

h) ATP-Bestimmung 21

2. Verwendete Substanzen 22

a) Vincamin 22

b) Dinitrophenol (DNP) 23

c) Albumin 23

d) Bicarbonat-Puffer 24

e) Phosphat-Puffer 24

3. Auswertung 25

III. ERGEBNISSE 27

1. Versuchsserie 1: 27
Vergleich der Fließfähigkeit in Bicarbonat-Puffer, Phosphat-Puffer und Plasma

2. Versuchsserie 2: 31
Vergleich der Fließfähigkeit mit verschiedener Vincamin Konzentration

3. Versuchsserie 2: 35
Vergleich der Fließfähigkeit von Erythrozyten mit veränderter Ruheform

IV. DISKUSSION 39

V. ZUSAMMENFASSUNG 47

VI. LITERATURVERZEICHNIS 50

I. EINLEITUNG

Die roten Blutkörperchen nehmen gegenüber den meisten anderen Zellen des menschlichen Körpers eine Sonderstellung ein.

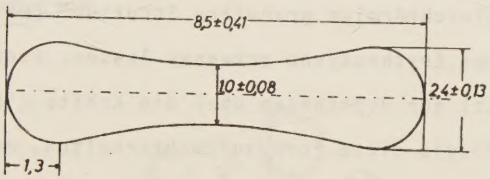


Abb. 1 Geometrie des Erythrozyten des Menschen nach Ponder Maße in µm.

Neben anderen Abweichungen (kein Zellkern, freie Beweglichkeit ohne Zellverband) fällt vor allem die nicht ohne weiteres erklärbare Ruheform auf. Schon bald nachdem man Zellen unter dem Mikroskop betrachten konnte, machte man sich Gedanken über die Ursache und den Sinn dieser Form.

So vermutete Haller (1757), ihre charakteristische Form sei die Folge fortlaufender "Abschleifungsvorgänge" in den Gefäßen.
So sehr wir diese "naive" Vorstellung heute belächeln, ist es doch bis jetzt noch nicht gelungen, eine endgültige Klärung dieses Phänomens zu erreichen. Ausgehend von den histologischen Untersuchungen, die selbst im Elektronen-Mikroskop nur "eine gleichförmige granuläre Struktur" (Wallraff 1967) des Erythrozyten erkennen lassen, konnten bis jetzt nur Hypothesen über die Kräfte ("bending energy"),die diese Form aufrechterhalten, aufgestellt werden (Brailsford 1973, Deuling 1977).
In diesem Zusammenhang ist auch von großem Interesse, daß diese Form sowohl dynamisch (Anpassung an die Strömung in engen Gefäßen), als auch statisch (Änderung der normalen Osmolarität; metabolische Einflüsse; Einwirkung bestimmter Fremdsubstanzen), geändert werden kann.

Bei der Änderung der Ruheform (Discozyt) durch Pharmaka gibt es zwei entgegengesetzte Möglichkeiten (Deuticke 1968): Entweder die Bildung von Stechapfelformen (Echinozyten) oder von tassenförmigen Erythrozyten (Stomatozyten). Mit steigender Konzentration des Pharmakons nähern sich die Zellen in beiden Fällen einer Kugelform (Spherozyten). Abweichend davon ist durch metabolische Einflüsse nur eine Echinozytenbildung möglich.

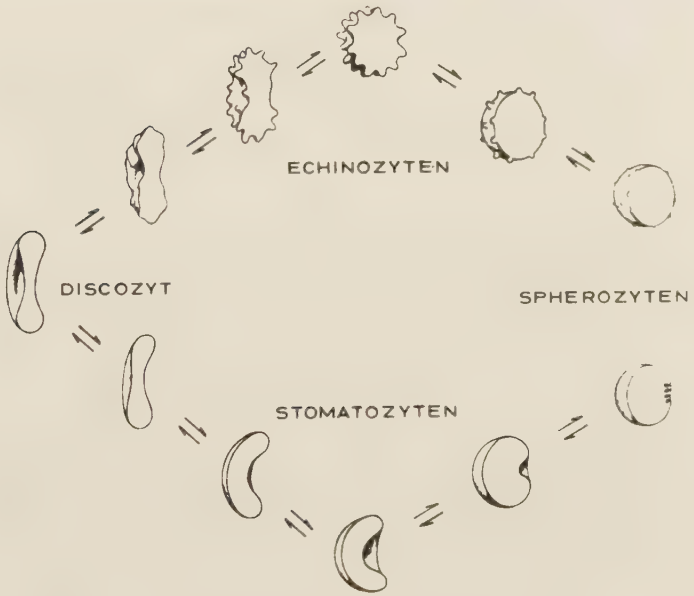


Abb. 2 Formveränderung menschlicher Erythrozyten durch amphiphile Pharmaka (nach Bessis 1977).

Bei Änderung der Osmolarität, bei der es ebenfalls zur Echinozyten-, bzw. Stomatozytenbildung kommt, ist eine Erklärung für die Änderung der Ruheform durch die dabei auftretende Volumenverschiebung relativ anschaulich möglich:
Höhere Osmolarität der umgebenden Lösung zieht Wasser aus der Zelle und bewirkt damit eine Verringerung des intrazellulären Volumens. Geht man davon aus, daß die Oberfläche der Zelle gleich bleibt, ist es ohne weiteres anschaulich, daß die im Verhältnis zum Volumen größer gewordene Zellmembran Stechapfelform annimmt. Auch das entgegengesetzte Verhalten ist - ähnlich dem Aufblasen eines Luftballons - leicht vorstellbar.

Schwieriger ist es, die ohne Verschiebung des intrazellulären Volumens auftretenden Formänderungen bei metabolischen Einflüssen und nach Einwirkung bestimmter Substanzen zu erklären. In diesem Fall liegt es nahe, Einwirkungen auf die Strukturen, die für die Erhaltung der Ruheform des Erythrozyten verantwortlich sind, anzunehmen.

Man kann davon ausgehen, daß diese Kräfte in erster Linie in der Membran des Erythrozyten lokalisiert sind (Deuticke 1968). Bei Änderung der Ruheform wäre dann auch die durch Scherkräfte bedingte "Verformung" der Zellen verändert. Deshalb lag es nahe, zu untersuchen, ob die "Verformbarkeit" der Zellen und damit auch ihre rheologischen Eigenschaften verändert sind.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen dem Fließverhalten menschlicher Erythrozyten im Verhältnis zu ihrer Form zu untersuchen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Methodik

a) Zweck und Prinzip der Messung

Um eine Aussage über das Fließverhalten bzw. die Deformierbarkeit von Erythrozyten unter verschiedensten Einflüssen zu ermöglichen, wurden diese in Suspensionslösungen oder Plasma unter konstantem Druck durch Glaskapillarfilter perfundiert. Dabei wurden Filter mit Kapillardurchmessern von 5 µm und 10 µm verwendet. Diese Dimensionen entsprechen in etwa den Gefäßquerschnitten im Bereich der Mikrozirkulation, die von Wallraff (1967) mit 5 µm bis 9 µm bzw. von Leonhardt (1969) mit 4 µm bis 15 µm angegeben wurden.

Die Durchflußrate - d.h. das Volumen der Erythrozytensuspension pro Zeiteinheit, das durch den Filter strömt - wurde mit einem Plethysmographen elektromechanisch gemessen und von einem Schreiber in Verbindung mit einer Meßbrücke registriert. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, daß die Meßkurve eine Beurteilung des Fließverhaltens über die

gesamte Meßzeit zuläßt und ein Aufzeichnen von Meßkurven während der Messung nicht nötig macht.

b) Meßkammer

Die Meßkammer besteht aus einem zylindrischen Zulaufgefäß, das wasserdicht an die Grundplatte geschraubt wird. Zwei Öffnungen in der Grundplatte dienen dem Zuführen von Luft und Wasser bzw. physiologischer Kochsalzlösung. Die Zufuhr wird mit kleinen Hähnen reguliert. Die Erythrozytensuspension wird über eine dritte Öffnung mit Hilfe einer 1 ml Spritze eingebracht. Das Zulaufgefäß ist durch eine Oberwurfmutter mit dem Auffanggefäß verbunden. Zwischen beiden befindet sich das Filterelement, wobei alle drei Teile dicht aufeinandergepaßt sind. Vom Auffanggefäß führt eine Öffnung am Gefäßboden zur Absaugvorrichtung.
Alle Teile sind aus poliertem Plexiglas gefertigt um den Versuchsablauf optisch überwachen zu können.

Die Meßkammer

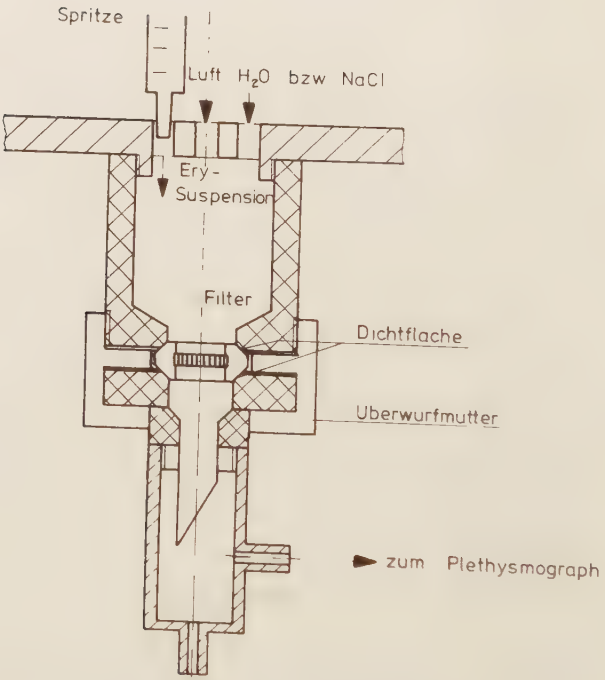


Abb. 3 Schematische Darstellung der Meßkammer im Querschnitt mit eingespanntem Filterelement.

c) Filter (Filterproblem)

Verwendet wurden in Kunststoffassungen geklebte Glaskapillarfilter mit einem Durchmesser von 12 mm und einer Dicke von 0,5 mm. Damit entsprach die Durchflußstrecke in etwa der einer Kapillare im Blutgefäßsystem, deren Länge mit durchschnittlich 1 mm angegeben (Leonhardt 1969). Betrachtet man die Filter unter dem Mikroskop, so sieht man gleichmäßig angeordnete, bienenwabenförmige Poren mit konstantem Durchmesser.

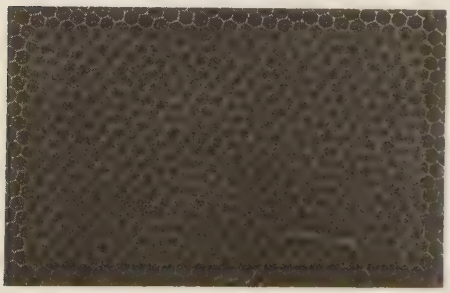


Abb. 4 Mikroaufnahme eines Glasfilters.

Um dem physiologischen Vorbild (Kapillare) möglichst nahe zu kommen, sind die Eigenschaften der Filter von ausschlaggebender Bedeutung. Deshalb soll hier ausführlich auf ihre Problematik eingegangen werden.

Im Gegensatz zu den häufig verwendeten Polycarbonat-Filtern (Gregersen 1967, Schmid-Schönbein 1970) konnten 4 Forderungen, die an ein ideales Filterelement gestellt werden, mit Glaskapillarfiltern besser erfüllt werden. Damit war es möglich, gleichmäßige Versuchsbedingungen zu gewährleisten.

Diese Forderungen sind im einzelnen:

1) Gleichmäßige Porengröße und -verteilung
2) Größere Porenfläche im Verhältnis zur Gesamtfläche
3) Die Filterdicke- und damit die Passagestrecke - soll in etwa der physiologischen Kapillarlänge (0,5 mm) entsprechen
4) Verwendung der gleichen Filterelemente über einen längeren Zeitraum

Zu 1) Diese Forderung wird bei Glaskapillarfiltern durch den Herstellungsprozeß

(identische Glaskapillaren werden zusammengefügt) weitgehend erfüllt. Im Vergleich dazu sieht ein Polycarbonatfilter - unter dem Mikroskop betrachtet - einem Blatt Papier, durch das eine Schrotladung geschossen wurde, ähnlich. Die Porengröße weist bei diesen Filtern zwangsläufig eine erhebliche Streuung nach oben und nach unten auf. Sie kann deshalb nur als statistischer Mittelwert angegeben werden (Schmid-Schönbein 1970). Es ist somit erklärlich, daß ein Teil der Erythrozyten ohne Verformung die Polycarbonatfilter passiert - nach Schmid-Schönbein 30% - und ein anderer Teil sofort stecken bleibt. Es dürfte einleuchten, daß es unter diesen Umständen wesentlich schwieriger ist, eindeutige Meßwerte zu erhalten.

Zu 2) Die zur Erythrozytenpassage verfügbare Fläche wird bei Polycarbonatfiltern mit 4,5% angegeben (Schmid-Schönbein 1970), während sie bei Glaskapillarfiltern bei 40 - 50% liegt. Bei dieser geringen Porenfläche beschreibt Schmid-Schönbein

"störende Sedimentationseffekte" und nachfolgend relativ schnelle Verstopfung der Polycarbonatfilter.

Zu 3) Die Dicke der von Schmid-Schönbein verwendeten Polycarbonatfilter der Firma Millipore SM wird von ihm mit 150 µm angegeben. Im Vergleich dazu ergibt sich eine über dreimal längere Passagestrecke (500 µm) bei den von uns verwendeten Glaskapillarfiltern. Die Erythrozyten bewegen sich also wesentlich länger unter Verformung im Filter "Hydrodynamische Eintrittseffekte" (Schmid-Schönbein 1970) und Oberflächenspannungsphänomene sind damit stärker zu vernachlässigen.

Zu 4) Um eine höchstmögliche Vergleichbarkeit und Konstanz der Meßergebnisse zu erzielen, ist es erstrebenswert, dieselben Filter über einen längeren Zeitraum zu verwenden. Bei Polycarbonatfiltern ist dies nicht möglich, da diese nach drei- bis viermaligem Gebrauch spätestens unbrauchbar werden (Risse, Brüchigkeit, verlangsamte

Flußzeiten) (Scholtz 1976). Glaskapillarfilter erwiesen sich dagegen als relativ widerstandsfähig. Sie standen längere Versuchsreihen ohne erkennbare Verschleißerscheinungen durch. Allerdings konnte nach Gebrauch über Monate plötzliches Auseinanderbrechen der einzelnen aneinandergeklebten Segmente beobachtet werden. Dies dürfte wahrscheinlich auf eine zu große Aggressivität der verwendeten Reinigungslösung (Deconex) zurückzuführen sein.

Abschließend ist festzustellen, daß auch nach weitgehender Erfüllung der vorgenannten Forderungen die bei den vorliegenden Messungen verwendeten Glaskapillarfilter noch nicht als absolut ideal anzusehen sind. Vor allem die Reinigung stellt zur Zeit noch das größte Problem dar. Die Poren sollen einerseits nach erfolgter Reinigung genau so durchgängig und sauber sein wie vorher, andererseits aber sollen der Reinigungsvorgang nicht zu grob und die Reinigungslösung nicht zu aggressiv sein. Dieses Problem war bei den zugrundeliegenden Versuchen nicht

einwandfrei gelöst. Deshalb konnte - trotz relativ identischer Filter - nicht darauf verzichtet werden die objektiv vorhandene Streuung der Filter durch gemittelte Vergleichmessungen zu relativieren.

d) Versuchsaufbau

Die Messungen wurden in der Regel gleichzeitig mit sechs Meßkammern, die auf der Grundplatte befestigt waren, durchgeführt. Die gesamte Meßvorrichtung befand sich in einer Wanne mit konstant 37°C Wassertemperatur. Die zum Filtrieren der Erythrozyten benötigte Druckluft wurde einem großen Behälter (Vol. 100 l) entnommen. Der Druck wurde mit Hilfe eines Manometers kontrolliert und durch ein entsprechend tief in das Wasserbad eingetauchtes, nach unten offenes Rohr eingestellt. Die überschüssige Luft konnte dort abperlen. Dadurch war es möglich in Verbindung mit dem Luftreservoir den Druck sehr konstant zu halten und zu regeln. Der Luftvorrat wurde von einem Kompressor über ein Reduzierventil ergänzt. Der Filtrierdruck betrug 5 bzw. 10 cm H_2O. Das destillierte Wasser oder die physiologische Kochsalzlösung wurde aus Infusionsflaschen, die unter

Oberdruck standen, der Meßkammer zugeführt. Die Absaugöffnung der Meßkammer war mit einem zwischengeschalteten Hahn an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Sämtliche bis jetzt beschriebenen Zuleitungen waren für alle sechs Kammern parallel geschaltet, so daß durch Schließen und Öffnen der jeweiligen Hähne das Arbeiten mit der nächsten Kammer ermöglicht wurde. Lediglich die nachfolgend beschriebene Verbindung zum Plethysmographen wurde an die nächste Kammer umgesteckt. Diese Zuleitung führte zu einem Dreiwegehahn. Dieser ermöglichte es, den Plethysmographen sowohl mit der Meßkammer zur Registrierung des filtrierten Volumens, als auch mit der Eichvorrichtung zu verbinden. Der Plethysmograph enthält einen leicht gängigen Kolben, der sich entsprechend dem zugeführten Volumen verschiebt. Diese Verschiebung wird über einem austarierten Hebel durch Fotozellen registriert und über eine Meßbrücke auf einen Schreiber übertragen. Dieser beschreibt eine Kurve, deren Verlauf einen Maßstab für die Flußgeschwindigkeit ergibt.
Der Schreiber wurde mit Hilfe der am Dreiwegehahn angeschlossenen Spritze geeicht. Dabei wurde ein

bestimmtes Volumen (in der Regel 0,5 ml) einem bestimmten Hub des Schreibers zugeordnet.

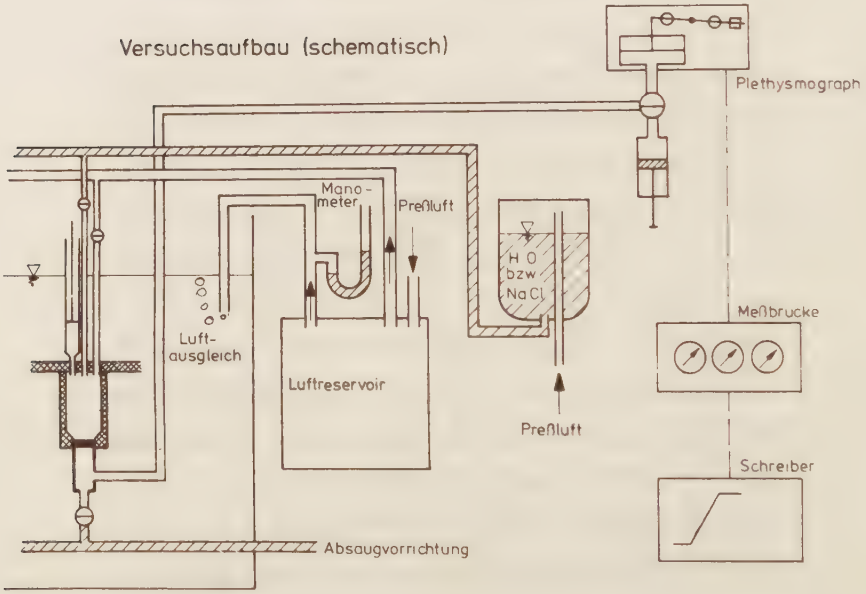


Abb. 5 Schematische Darstellung der gesamten Versuchsapparatur.

e) Vorbereitung des Versuchs

Als erstes wurden die zur Herstellung der Erythrozytensuspension benötigten Puffer angesetzt. Das für die Versuchsreihe verwendete Blut wurde aus der vena cubitalis gesunder Probanden entnommen und unverzüglich heparinisiert. Die Trennung der geformten Bestandteile des Blutes vom Plasma erfolgte durch Zentrifugieren (ca. 2000 g) über einen Zeitraum von 15 min. Nach dem Zentrifugieren wurde das oben befindliche Plasma vorsichtig abgesaugt und in Zentrifugengläschen abgefüllt. Die darunter befindlichen Blutkörperchen wurden mit Pufferlösung (Bikarbonat-Puffer oder Phosphat-Puffer) ungefähr im Verhältnis 1 : 1 durchgemischt. Sowohl das bereits abgefüllte Plasma, als auch das Erythrozyten-Puffergemisch wurden nochmals 15 min. lang zentrifugiert. Das Plasma wurde wiederum von den noch vorhandenen Erythrozyten abgehebert und von Kleinpartikeln durch Filtrieren (Porengröße 1,2 µm) befreit. Bei dem Erythrozyten-Puffergemisch wurde nach dem Zentrifugieren

die überstehende Pufferlösung und der sogenannte "buffy coat" - ein Oberstand der Leukozyten - abgesaugt.
Zuletzt wurde - entsprechend den jeweiligen Versuchsbedingungen - die gewünschte Hämatokritkonzentration (in der Regel 30%) mit einem der vorher angegebenen Puffer oder dem gereinigten Plasma hergestellt. Die Kontrolle des Hämatokrits erfolgte mit dem Verfahren nach Strumia (Kapillarröhrchen in der Spezialzentrifuge). Nach dem Aufteilen der Erythrozytensuspension in verschiedene Ansätze und dem Zufügen der Pharmaka konnte mit den Messungen begonnen werden.

f) Versuchsdurchführung

Nach dem Aufbau der Apparatur und dem Eichen des Schreibers wurde als erstes die Flußrate von destilliertem Wasser bzw. physiologischer Kochsalzlösung dreimal an allen sechs Filtern gemessen. Die Durchführung des Versuchs verlief wie folgt:

Aus der unter Druck stehenden Infusionsflasche wird eine bestimmte Menge Flüssigkeit in die Meßkammer eingelassen, um zu verhindern, daß vor Beginn der Messung die Flüssigkeit durch den Filter gedrückt wird.
Nun wird die Verbindung von der Meßkammer zum Plethysmographen hergestellt und das Laufwerk des Kurvenschreibers in Gang gesetzt. Mit dem Öffnen des Lufthahns an der Meßkammer beginnt der eigentliche Meßvorgang. Die eindringende Luft preßt die Flüssigkeit durch das Filter und verdrängt eine entsprechende Luftmenge im Auffanggefäß. Diese verschiebt den Meßkolben im Plethysmographen und bewirkt einen entsprechenden Ausschlag pro Zeiteinheit des Kurvenschreibers. Damit ist die Messung und Registrierung des Ergebnisses abgeschlossen. Nunmehr wird die durchgepreßte Flüssigkeit abgesaugt und der Schreiber in Nullstellung gebracht. Der gesamte Vorgang wird zweimal wiederholt. Als nächster Versuchsschritt wird die Flußrate des jeweiligen Lösungsmittels (Bikarbonat-Puffer, Phosphat-Puffer, Plasma) gemessen. Hierzu wird die auf 37°C im

Wasserbad erwärmte Lösung bzw. Plasma mit Hilfe einer 1 ml Spritze in die Meßkammer eingebracht. Die Messung verläuft wie zuvor beschrieben. Als letztes werden die Spritzen mit Erythrozytensuspension gefüllt, auf die Meßkammer gesteckt, in einem Zeitraum von 2 min. auf 37°C erwärmt und anschließend die Flußrate gemessen.

g) Filterreinigung

Wegen der unvermeidlichen Verstopfung der Filter war es notwendig, die 5 µm-Filter nach jedem Meßgang gründlich zu reinigen. Bei den 10 µm-Filtern genügte es, die Reinigung erst nach 2 Meßvorgängen vorzunehmen. Diese wurde mit 2% Deconex-Lösung durchgeführt. Die Filterelemente wurden zuerst in die angewärmte Lösung (60°C) eingelegt und nach 10 min. mit einer Spritze vorsichtig durchgespült. Die anhaftende Deconexlauge (pH 11) wurde anschließend durch Eintauchen in eine schwache Säure neutralisiert. Der letzte Reinigungsgang erfolgte mit dest.

Wasser. Wie schon zuvor angedeutet, kann dieses Verfahren noch nicht als ideal angesehen werden, da sich das bisher verwendete Deconex als zu agressiv herausstellte.

h) ATP-Bestimmung

Die ATP-Bestimmung wurde mit den Reagenzien der Testkombination von Boehringer Mannheim (Best. Nr. 123 897) nach der Methode von Bücher (1947) durchgeführt.

2. Verwendete Substanzen

a) Vincamin

Alcaloid aus vinca minor gewonnen (R.H.F. Manske). Nach Manske ähnliche Struktur wie die Rauwolfia-Alcaloide.

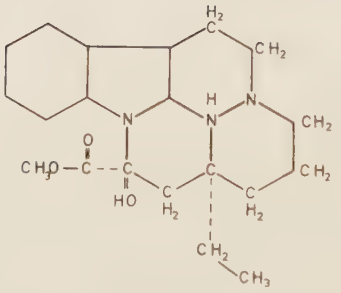


Abb. 6 Strukturformel von Vincamin.

b) 2,4 Dinitrophenol (DNP)

Nach B.Deuticke (1968) erzeugt 2,4 DNP Stechapfelform bei Erythrozyten. Nach unseren Beobachtungen genügte eine Konzentration von 10^{-4} mol/l um 100% Echinozyten zu erzeugen. Bei unseren Versuchen wurde deshalb ausschließlich mit dieser Konzentration gearbeitet.

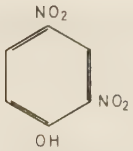


Abb. 7 Strukturformel von 2,4 Dinitrophenol.

c) Albumin

Verwendet wurde Albumin in einer Konzentration von 2,5 mg/ml. Die Lösung wurde mit gefriergetrocknetem Albuminkonzentrat hergestellt, das der Pufferlösung (Krebs-Henseleit) zugemischt wurde.

d) Bicarbonat-Puffer (Krebs-Henseleit)

Zusammensetzung:		
	NaCL	118 mM
	KCL	4,7 mM
	$CaCL\ 2H_2O$	2,6 mM
	KH_2PO_4	1,2 mM
	$MgSO_4\ 7H_2O$	1,2 mM
	$NaHCO_3$	25,0 mM

Der Puffer wird durch Begasung mit Carbogen (95% O_2, 5% CO_2) auf pH 7,4 eingestellt.

e) Phosphat-Puffer (Parpat-Stammlösung)

Zusammensetzung:		
	NaCL	1,0176 M
	Na_2HPO_4	0,1233 M

Durch Zufügen von 10%iger NaOH wurde ein pH-Wert von 6,9 eingestellt. (Stammlösung)
Zum Herstellen von 100 ml Gebrauchslösung wurden 9,3 ml der Stammlösung benötigt, die mit destilliertem Wasser verdünnt wurden. Eine jetzt noch evt. vorhandene Abweichung der Gebrauchslösung vom pH-Wert 7,4 wurde durch Zugabe von destillietem Wasser bzw. von Parpat-Lösung korrigiert.

3. Auswertung

Die Versuche wurden mit Hilfe der aufgezeichneten Kurven ausgewertet. Dabei wurden als erstes die Durchflußraten entsprechend der Steilheit der Kurven bestimmt. Diese Werte wurden dann in 3 Gruppen zusammengefaßt.

1. Durchflußraten von Wasser bzw. phys. Kochsalzlösung als Mittelwerte der drei Einzelmessungen.
2. Durchflußraten der jeweiligen Suspensionslösungen (Krebs,Parpat oder Plasma).
3. Durchflußraten der Erythrozytensuspension.

Als nächster Schritt wurden die Werte der einzelnen Gruppen zueinander ins Verhältnis gesetzt, wobei die Werte der ersten bzw.zweiten Gruppe als 100% gerechnet wurden. Mit diesem Vorgehen wurden die unvermeidlichen Schwankungen der absoluten Flußraten relativiert und somit untereinander vergleichbar gemacht. Die gefundenen Werte wurden pro Versuch ermittelt. Als letzter Schritt wurden diese Mittelwerte je nach Fragestellung zusammengefaßt und daraus

wiederum der Mittelwert gebildet und - soweit sinnvoll - die Standardabweichung berechnet. Die Ergebnisse wurden in Relation zur jeweiligen Standardflußrate graphisch dargestellt.

III. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Fragestellungen untersucht:

1. Wie beeinflussen verschiedene Suspensionslösungen das Fließverhalten der Erythrozyten im Verhältnis zur ATP-Konzentration.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Versuche mit folgenden Suspensionen bei einem Hämatokrit von 30% durchgeführt:

a) Krebs-Henseleit-Puffer
b) Phosphat-Puffer und
c) filtriertes Plasma

Um das Fließverhalten der Erythrozyten bei Veränderung der ATP-Konzentration zu erfassen, wurde sofort nach dem Ansatz und nach Inkubation von 2, 4 und 6 Std. bei 37^{o}C die Flußrate gemessen. Die Messungen wurden mit 5 µm-Filtern durchgeführt.

ATP-Bestimmung

Veränderung der ATP-Konzentration bei Inkubation mit 37°C über 6 Std. in % des Ausgangswertes. (Abb. 8)

$n = 7 \; (\bar{x} \pm s_0)$

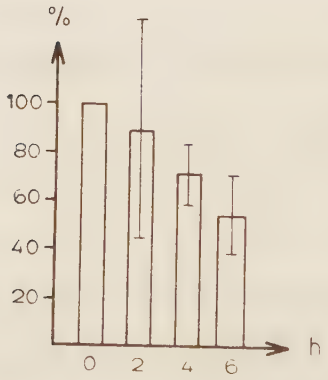
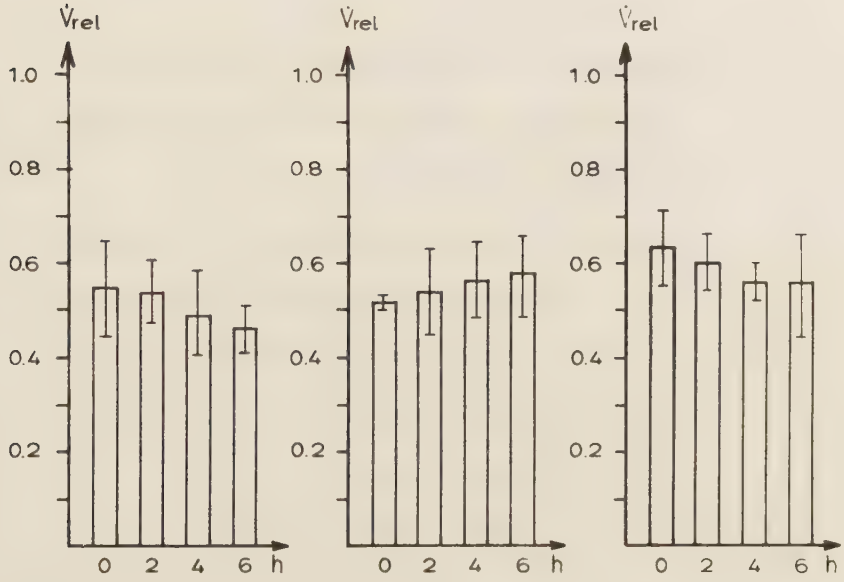


Abb. 8

Es zeigt sich ein gleichmäßiger Abfall der ATP-Konzentration.

Relative Flußrate ($\dot{V}rel$) von Erythrozytensuspensionen mit Krebs-Henseleit-Puffer, Parpat-Puffer und Plasma. (Hk 30, Filtrationsdruck 10 cm H_2O, Porendurchmesser 5 µ) (Abb. 9)



Krebs-Henseleit n=4

Parpat n=2

Plasma n=4

Abb. 9

1. Die Krebs-Henseleit- und die Parpatsuspension zeigen keine signifikanten Unterschiede. Plasma hat eine etwa 15 % höhere relative Flußrate.
2. Die Krebs-Suspension zeigt eine abnehmende Flußrate mit abnehmender ATP-Konzentration.
3. Dagegen steigt die Flußrate von Parpat-Suspensionen gleichmäßig an.
4. Bei der Plasma-Suspension ist wie bei der Krebs-Henseleit-Suspension ein Abfall der Flußrate zu beobachten.
5. Sowohl die in Krebs-Henseleit als auch die in Parpat inkubierten Erythrozyten hatten nach 6 Std. Stechapfelform. Im Gegensatz dazu keine Veränderung der Normalform im Plasma.

2. Wie ändert sich das Fließverhalten der Erythrozyten bei Zugabe von Vincamin in verschiedenen Konzentrationen?

Bei dieser Versuchsreihe waren die Erythrozyten bei einem Hämatokrit von 30% im Krebs-Henseleit-Puffer suspendiert. Die Flußrate wurde mit den 10 µ-Filtern bei folgenden Vincamin-Konzentrationen gemessen:

0,01	µg/ml	$= 2{,}6 \times 10^{-11}$ mol/l
0,1	µg/ml	$= 2{,}6 \times 10^{-10}$ mol/l
1	µg/ml	$= 2{,}6 \times 10^{-9}$ mol/l
10	µg/ml	$= 2{,}6 \times 10^{-8}$ mol/l
1000	µg/ml	$= 2{,}6 \times 10^{-6}$ mol/l

Die Konzentrationen bei den 5 µ-Filtern waren:

0,01	µg/ml	$= 2{,}6 \times 10^{-11}$ mol/l
0,1	µg/ml	$= 2{,}6 \times 10^{-10}$ mol/l
1	µg/ml	$= 2{,}6 \times 10^{-9}$ mol/l
100	µg/ml	$= 2{,}6 \times 10^{-7}$ mol/l
1000	µg/ml	$= 2{,}6 \times 10^{-6}$ mol/l

Die Zeitabhängigkeit wurde durch Messung nach Inkubation über 6 Std. bei 37°C untersucht.

Relative Flußrate von Erythrozytensuspensuionen unter Zugabe von Vincamin (Hk 30%, Filtrationsdruck 10 cm H_2O, Krebs-Henseleit-Puffer) (Abb. 10)

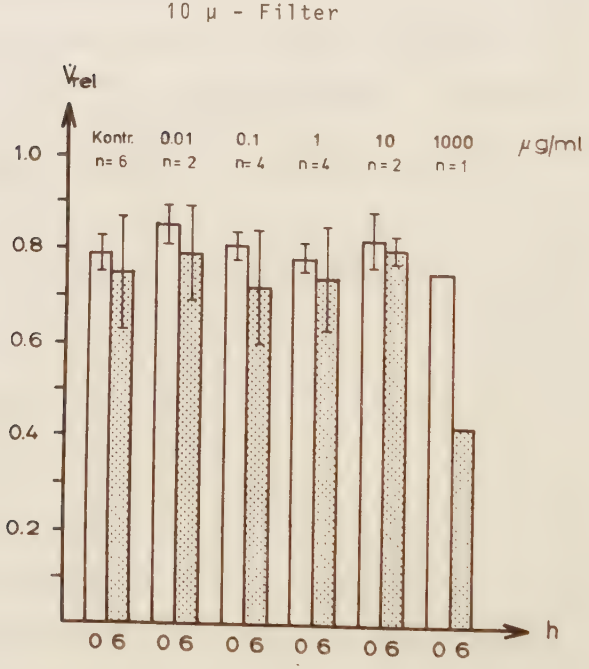


Abb. 10

Relative Flußrate von Erythrozytensuspensionen unter Zugabe von Vincamin (Hk 30%, Filtrationsdruck 10 cm H_2O, Krebs-Henseleit-Puffer) (Abb. 11)

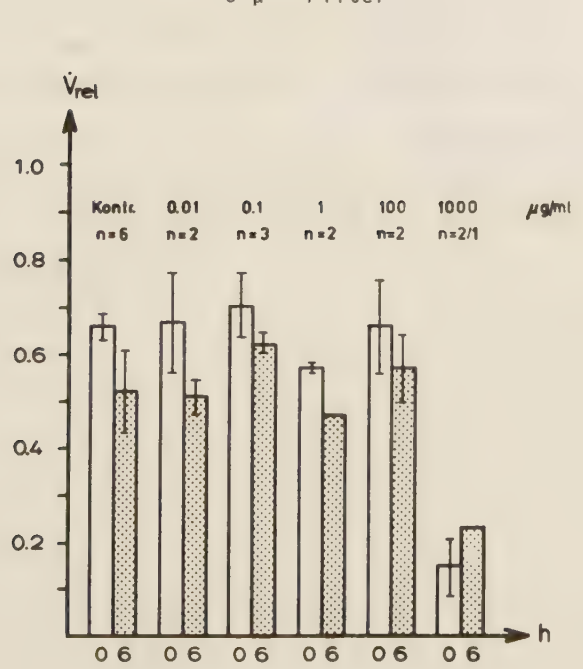


Abb. 11

1. Bei Durchfluß durch die 10 µ-Filter waren keine signifikanten Unterschiede im Bereich bis 10 µg/ml zu erkennen.
2. Auch bei den 5 µ-Filtern war bis zur Konzentration 100 µg/ml keine eindeutige Tendenz vorhanden.
3. Erst bei 1000 µg/ml fiel die Flußrate bei beiden Filtergrößen deutlich ab.
4. Sowohl bei den 10 µ- als auch bei 5 µ-Filtern lag mit Ausnahme von 1000 µg/ml der Wert nach 6 Std. Inkubation durchgehend 10% - 20% unter dem Anfangswert.
5. Bei 1000 µg/ml hatten die Erythrozyten cup-Form.

3. Welche Beziehung hat die Flußrate zur Ruhe-Form der Erythrozyten?

Als Suspension diente Krebs-Henseleit-Puffer sowohl ohne, als auch mit Albumin (2,5 mg/ml). In diesem Medium hatten die Erythrozyten Normalform. Um eine Formveränderung der Erythrozyten zu bewirken wurde bei dieser Versuchsreihe 2,4 Dinitrophenol 10^{-4}molar als Pharmakon zur Erzeugung einer Stechapfelform und Vincamin in einer Konzentration von 1 mg/ml zur Bildung einer "cup"-Form verwendet. Der Hämatokrit betrug 30%. Die Messungen wurden unmittelbar nach dem Ansatz durchgeführt.

Vergleich der Erythrozytenfließfähigkeit in Abhängigkeit von der Form (Hk 30%, Druck 5 cm H_2O, Porendurchmesser 5 µ, Krebs-Henseleit-Puffer) (Abb. 12)

ohne Albumin (n=1)

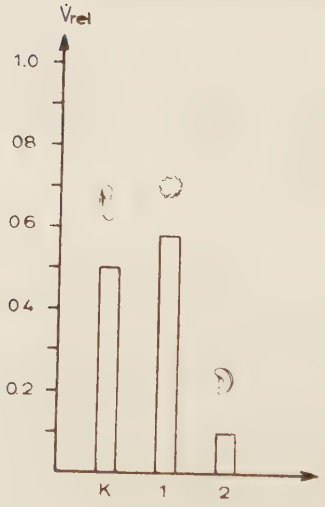


Abb. 12

Vergleich der Erythrozytenfließfähigkeit in Abhängigkeit von der Form (Hk 30%, Druck 5 cm H_2O, Porendurchmesser 5 µ, Krebs-Henseleit-Puffer) (Abb. 13)

mit Albumin (n=3)

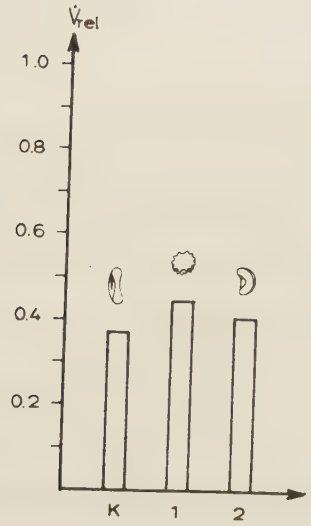


Abb. 13

1. Die stechapfelförmigen Erythrozyten hatten sowohl ohne als auch mit Albumin die höchste Flurate.

2. Unter dem Einfluß von Albumin ist kein signifikanter Unterschied zwischen Normal- und "cup"-Form zu erkennen, dagegen sind die ohne Albumin angesetzten "cup"-Erythrozyten deutlich langsamer.

IV. DISKUSSION

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß bei normaler intrazellulärer ATP-Konzentration die Wahl des Suspensionsmediums keinen Einfluß auf die Filtrierbarkeit bzw. die Verformbarkeit der Erythrozyten hat. Die etwa 15% höhere relative Flußrate der Plasma-Suspension muß insofern kritisch gewürdigt werden, als Plasma gegenüber den anderen zwei Suspensionslösungen eine wesentlich höhere Viskosität hat. (0,9%ige Kochsalzlösung 0,5 cp, Plasma 1,2 cp bei $37^{o}C$).

Eine Erklärung für diese Abweichung könnten die von Schmid-Schönbein (1970) beschriebenen Zusammenhänge zwischen der Viskosität der gesamten Erythrozytensuspension und der Viskosität des jeweiligen Lösungsmediums sein. Nach seinen Ergebnissen ist die Differenz zwischen beiden umso geringer, je höher die Viskosität des Mediums (Plasma, Salzlösung) ist. Seiner Ansicht nach bewegen sich die Erythrozyten bei höherer Viskosität des Lösungsmittels nicht mehr wie elastische aber doch feste Körper in einer Umgebungsflüssigkeit, sondern eher wie Tropfen in einer Emulsion. Dieses "emulsionsartige" Verhalten läßt sich nach Schmid-Schönbein auch daraus ableiten, daß ein auf 98%

konzentrierter Erythrozytenbrei sich wie eine hochvisköse Flüssigkeit verhält.
Es sei noch vermerkt, daß dieses Phänomen auch von der Größe der Fließschubspannung abhängig ist. Dieser Einfluß kann aber in der vorliegenden Betrachtung außer Acht gelassen werden, da die Flieschubspannung konstant gehalten wurde.

Mögliches Verhalten von Erythrozyten in engen Röhren.
(gleiche Fließschubspannung)

Salz-Lösung (niedrigere Viskosität)

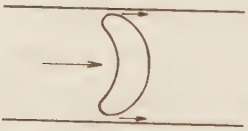


Abb. 14 a

Bei niedriger Viskosität weniger starke Verformung der Erythrozyten und damit stärkeres Abbremsen des Flüssigkeitsstromes = höhere relative Gesamtviskosität.

Plasma (höhere Viskosität)

Abb. 14 b

Bei höherer Viskosität "tropfenförmiges Mitschwimmen" = niedrigere relative Gesamtviskosität.

Metabolsiche Veränderung

Der nicht signifikante, aber in der Tendenz vorhandene Abfall der Verformbarkeit bei Krebs-Henseleit-Puffer und Plasma deckt sich mit den Ergebnissen von Weed und La Celle (1969), die ebenfalls nach 4 - 6 Std. parallel zur Abnahme des ATP-Gehaltes, den ersten Abfall der Verformbarkeit beschreiben. Da Phosphat-Puffer im Gegensatz zu Krebs-Henseleit-Puffer und Plasma kein Calcium enthält, drängt sich zunächst der Schluß auf, daß Calcium in Zusammenhang mit ATP eine wichtige Funktion für die Änderung der Membranverformbarkeit einnimmt. Dieser Schlußfolgerung steht aber entgegen, daß Calcium nur sehr langsam durch die Membran diffundiert und außerdem aktiv aus der Zelle transportiert wird (H.G. Ferreira und V.L. Lew 1977). Unter dieser Voraussetzung wäre es denkbar, daß der Abfall der Flußrate bei Krebs-Henseleit-Puffer und Plasma durch allmähliche Bildung von Calciumkristallen, die die Durchgängigkeit behindern, verursacht wird. Der Einfluß der intrazellulären ATP-Konzentration wird von Feo und Mohandas (1977) als nicht entscheidend für die Zell-Verformbarkeit angesehen.

Sie berichten, daß sie bei Erythrozyten, deren ATP-Konzentration sehr schnell reduziert wurde, trotzdem die Zellverformbarkeit unverändert blieb. Im Gegensatz zu unserem Verfahren wurde der schnelle ATP-Abfall durch Enzymblockade erreicht.
Dabei ändert sich die Normalform der Erythrozyten über zwei Stunden nicht. Bei der allmählichen ATP-Reduzierung über längere Zeit (bis 24 Stunden) durch Glukose-Entzug kommen sie auf dasselbe Ergebnis wie Weed und La Celle ; d.h. sie stellen ebenfalls einen Abfall der Verformbarkeit fest.
Feo und Mohandas interpretieren die gleichzeitige mit dem langsamen ATP-Abfall ablaufende Umwandlung vom Discozyten zum Echinozyten als entscheidenden Faktor für die rheologische Veränderung.
Sie sehen nicht primär den Abfall des ATP-Gehalts, sondern die Stechapfelbildung als Ursache der verminderten Verformbarkeit an. Die Tendenz bei den in Phosphat-Puffer inkubierten Erythrozyten und auch unsere anderen Ergebnisse scheinen zunächst dazu im Widerspruch zu stehen. Wir konnten gerade bei Echinozyten eine bessere Filtrierbarkeit als bei Discocyten feststellen.

Diese abweichenden Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch die verschiedenen Methoden zur Messung der Verformbarkeit erklären. Es ist vorstellbar, daß sich stechapfelförmige Erythrozyten beim Durchströmen sehr enger Kapillaren anders verhalten als in Viskosimetern. Erythrozyten in Viskosimetern stoßen ständig zusammen, während sie enge Kapillaren einzeln durchströmen. Bei diesen Zusammenstößen könnte es zu einem "Verhaken" der Oberflächenfortsätze kommen, während die Einzelechinozyten die Kapillare, auf Grund ihres kleineren Gesamtdurchmessers, schneller passieren als Discozyten oder cupförmige Zellen.

Ein weiterer Grund dafür dürfte sein, daß im Gegensatz zu Viskosimetern, in engen Kapillaren keine Aggregationen möglich sind.

Veränderungen durch Pharmaka

Die bei den Versuchen mit Vincamin ermittelten Ergebnisse deuten darauf hin, daß Vincamin nur in höherer Konzentration (1 mg/ml) Auswirkung auf die Fließfähigkeit von Erythrozyten hat. Der Abfall der Flußrate nach 6 Stunden bewegt sich in ähnlichen Größenordnungen wie bei den zuvor besprochenen Versuchen mit Krebs-Henseleit-Puffer. Das einzige davon abweichende Ergebnis (1 mg/ml Konzentration, 5 µ-Filter) dürfte durch Meßungenauigkeiten zu erklären sein; zumal der abweichende 6 Stunden-Wert nur durch eine Versuchsreihe belegt ist. Die bei höherer Vincaminkonzentration parallel zur Abnahme der Fließfähigkeit zu beobachtende Formveränderung (Bildung einer "cup"-Form) könnte eine Erklärung für diese Ergebnisse darstellen. Deshalb erscheint es am sinnvollsten diese zusammen mit den Ergebnissen der dritten Versuchsserie zu erörtern. Gegenstand dieser Untersuchungen war die Beziehung von der Form der Erythrozyten ("Stechapfel" -Form, Normalform, "cup" -Form) zu ihrer Fließfähigkeit.

Spekulativ war dabei zu erwarten, daß jede Abweichung von der physiologischen Normalform (Discozyt) eine Verschlechterung der Fließeigenschaften zur Folge hat.

Feo und Mohandas interpretieren ihre Ergebnisse - wie schon vorher erwähnt - in dieser Richtung.

Auch die Filtrationsversuche von Schmid-Schönbein mit osmotisch veränderten Zellen ergaben bei unveränderter Zellform d.h. isomolaren Bedingungen ein Optimum der Passagefähigkeit. Diese Erwartung wurde bei den "cup"-förmigen Zellen auch bestätigt. Hier war tatsächlich eine um mehr als die Hälfte geringere Flußrate zu beobachten.

Im Gegensatz dazu zeigten die stechapfelförmigen Erythrozyten eine um ungefähr 30% höhere Flußrate als die Discozyten.

Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte meines Erachtens im Zusammenhang mit der "bilayer"-Theorie von Sheetz und Singer (1974) gesehen werden. Nach dieser Theorie ändert sich die Form des Erythrozyten entweder durch Anlagerung an den inneren oder äußeren Teil der Doppelmembran im antagonistischen Sinne.

Im einen Fall führt eine Anlagerung an der inneren Membran zur stärkeren Anspannung und damit zur Bildung einer "Cup" - Form. Mit der damit verbundenen stärkeren Rigidität wäre auch zwangsläufig eine geringere Fließfähigkeit erklärt. Im entgegengesetzten Fall führt eine "schlaffere" Membran zur Bildung von Ausstülpungen (Echinozyt) und damit gekoppelt zu einer besseren Filtrierbarkeit.

Bei den parallel durchgeführten Versuchen mit Albuminzusatz war von Interesse, ob abweichende Ergebnisse auftreten. Nach Untersuchungen von Jay (1975) soll durch Albuminzugabe eine Versteifung der Membran und damit eine Stabilisierung der Ruheform von Erythrozyten erzielt werden. Deshalb war zu erwarten, daß die Fließfähigkeit etwas reduziert ist. Die vorliegenden Ergebnisse stützen diese These. Inwieweit sich die große Differenz zu den cup-förmigen Zellen ohne Albumin, auf den vorher erwähnten Mechanismus oder auf eine abgeschwächte Vincaminwirkung (Albuminbindung) zurückführen läßt, bedarf noch genauerer Untersuchungen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Nach einer Betrachtung über die Ruheform des menschlichen Erythrozyten und ihre statische und dynamische Veränderung wird auf die Frage, wie sich Veränderungen der Ruheform auf das Fließverhalten menschlicher Erythrozyten auswirkt, eingegangen.

Im nachfolgenden Teil, Methodik, erfolgt eine Beschreibung der Apparaturen, des Versuchsablaufes und der verwendeten Substanzen. Gemessen wurde die Filtrationsfähigkeit von Erythrozyten beim Durchströmen durch Glaskapillarfilter unter definierten Bedingungen (Filtrationsdruck, Hämatokrit, Porendurchmesser). Die Auswertung erfolgte in Form der "relativen Flußrate", um die schwankende "absolute Durchgängigkeit" der Filter auszugleichen. Die zusammengefaßten Werte wurden in Form von Säulendiagrammen dargestellt.

Es wurden drei Versuchsserien durchgeführt. Bei der ersten wurde das Fließverhalten von Erythrozyten in verschiedenen Suspensionslösungen (Bicarbonat-, Phosphat-Puffer und Plasma) im Verhältnis zur ATP-Konzentration untersucht.

In Bicarbonat-Puffer und Plasma nahm die Fließfähigkeit der Erythrozyten parallel zum ATP-Abfall ab. In Phosphat-Puffer zeigte sich eine Tendenz zur Verbesserung der Fließfähigkeit trotz Abfalls der ATP-Konzentration. Die in Bicarbonat-Puffer und Phosphat-Puffer suspendierten Erythrozyten hatten mit abnehmender ATP-Konzentration Stechapfelform. In Plasma behielten sie Normalform.

Die zweite Versuchsserie wurde mit Vincamin in verschiedenen Konzentrationen(0,01 µg/ml bis 1000 µg/ml) durchgeführt. Dabei war nur bei sehr hoher Konzentration (1000 µg/ml) ein deutliches Abfallen der Flußrate zu beobachten. Gleichzeitig konnte bei dieser Konzentration die Ausbildung einer "cup"-Form registriert werden.

Bei der dritten Versuchsserie wurde die Flußrate in Abhängigkeit von der Form (Normalform, Stechapfelform,"cup"-Form) untersucht.

Die Stechapfelform wurde mit 2,4 Dinitrophenol (10^{-4}molar), die "cup"-Form durch Vincamin (1000 µg/ml) erzeugt.

Als Suspensionslösung diente Bicarbonat-Puffer; sowohl ohne als auch mit Albuminzusatz.

In beiden Suspensionslösungen hatten die stechapfelförmigen Erythrozyten die höchste Flußrate. Mit Albumin-Zusatz hatten sowohl die Discozyten (Normalform) als auch die Echinozyten ("Stechäpfel)" eine um etwa 15% niedrigere Flußrate. Die "cup"-förmigen Zellen waren ohne Albumin-Zusatz stark verlangsamt; mit Albumin etwa gleichschnell wie die Discozyten.

Die Diskussion bringt eine Besprechung der eigenen Ergebnisse im Vergleich zu anderen Autoren. Die Ergebnisse zeigen, daß die Messungen der rheologischen Eigenschaften der Erythrozyten in Kapillaren, unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich zu der Messung mit üblichen Viskosimetern ergeben.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1) BESSIS, M. : Blood Smears Reinterpreted
Springer Verlag, 50-51 (1977)

2) DEUTICKE, B. : Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and changes of ionic environment
Biochimica et biophysica acta 163, 494-500 (1968)

3) FEO, C. and MOHANDAS, N.: Role of ATP-Depletion on Red Cell Shape and Deformability
Blood Cells 3, 153-161 (1977)

4) FERREIRA, H.G. and LEW, V.L.: Passive Ca transport and cytoplasmic Ca buffering in intact red cells
Membrane Transport in Red Cells
Academic Press, 66-68 (1977)

5) GREGERSEN, M.I., BRYANT, C.A., HAMMERLE, W.E.; USAMI, S., CHIEN, S.: Flow characteristics of human erythrocytes through polycarbonate sieves. Science 157, 825-827 (1967)

6) HALLER, A. von: Elementa physiologiae corporis humani T.2: Sanguis, eius motus, humorum separation. Lausanne (1757) Zit. nach Schmid-Schönbein

7) JAY, A. : Effect of Albumin on Cell Geometry Biophysical Journal 15, 205-222 (1975)

8) LEONHARDT, H. : Histologie und Zytologie des Menschen. 2. Auflage Thieme Verlag (1969)

9) MANSKE, R.H.F., SAXTON, J.E.: The Alkaloids VII, Academic Press, 121-122 (1960)

10) PONDER, E. : Hemolysis and related phenomena,
New York Grune and Stratton (1948)

11) SCHMID-SCHÖNBEIN, H.: Rheologische Eigenschaften
der Erythrozyten
Habilitationsschrift München (1970)

12) SCHOLTZ, P. : Über die Beeinflußbarkeit des
Fließverhaltens von Erythrozyten
und Gesamtblut durch Pharmaka
Diss. München (1976)

13) SHEETZ, P., SINGER, S.J.: Biological Membranes as
Bilayer Couples. A. Molecular
Mechanism of Drug-Erythrocyte
Interactions
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 71,
4457-4461 (1974)

14) WALLRAFF, J. : Leitfaden der Histologie des
Menschen
Urban und Schwarzenberg (1967)

15) WEED, R.I., LA CELLE, P.L. and MERRILL, E.W.:
Metabolic Dependence of Red Cell Deformability
The Journal of Clinical Investigation 48, 795-809 (1969)

Herrn Priv.-Doz. Dr. med Jörg Remien danke ich für die Oberlassung des Themas und sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med Manfred Kiese danke ich, daß er es mir ermöglichte, die Arbeiten an seinem Institut durchzuführen.

Fräulein S. Schwaiger danke ich für ihre freundliche Hilfe in technischen Fragen.

Meiner Frau und Fräulein U. Sand
danke ich für die Ausführung der
Schreibarbeiten. Herrn J. Klein
danke ich für die Mithilfe bei den
Zeichnungen.

L E B E N S L A U F

Ich, Gerhard W i e s e , wurde am 20. Juli 1948 in Hermaringen Krs. Heidenheim (Bd.-Wttbg.) geboren.

Meine Eltern sind der Maurerpolier Otto Wiese und dessen Ehefrau Babette Wiese, geb. Reinhardt.

1955 - 1959	Volksschule Hermaringen
1959 - 1967	Naturwissenschaftliches Gymnasium in Giengen an der Brenz

Nach Abschluß der Reifeprüfung im Juli 1967 leistete ich freiwillig zwei Jahre als Offiziersanwärter in der Sanitätstruppe ab.

Zum Sommersemester 1970 erhielt ich meine Zulassung zum Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Nach dem ersten Semester wechselte ich zum Studium der Zahnheilkunde.

- zahnärztl. naturwissenschaftliche Vorprüfung im März 1971
- zahnärztl. Vorprüfung im April 1973

Nach Abschluß des Staatsexamens im Juli 1976 erhielt ich meine Bestallung als Zahnarzt.

Seit März 1977 bin ich als Assistent in einer Zahnarztpraxis in Gräfelfing b. München tätig.

München, 5. Februar 1980